

濒危植物观光木遗传多样性及遗传结构分析

徐刚标¹, 吴雪琴¹, 蒋桂雄², 胡尚力¹, 刘雄盛¹, 肖玉菲¹, 郝博搏¹

(¹中南林业科技大学林木遗传育种实验室, 长沙 410004; ²广西壮族自治区林业厅, 南宁 530028)

摘要: 采用筛选的 8 条 ISSR 引物对濒危植物观光木 13 个野生种群的遗传多样性及遗传结构进行分析, 结果显示: 物种和种群水平上多态性位点百分率分别为 79.67% 和 46.84%, Shannon 表型多样性指数分别为 0.3880 和 0.2192, 与木兰科其他近缘植物相比, 遗传多样性水平较高; 分子方差分析表明, 观光木野生种群间遗传分化系数为 0.3752, 种群间存在显著的遗传距离; STRUCTURE 分析和 UPGMA 聚类表明, 参试的 13 个野生种群可分为 3 大类群; 相关性分析表明, 种群间遗传距离与其地理距离呈显著正相关。南昆山、笔架山、弄相山种群的遗传多样性最丰富, 建议优先加以保护。

关键词: 观光木; ISSR 标记; 遗传多样性; 遗传结构

Genetic Diversity and Population Structure of an Endangered Species: *Tsoongiodendron odorum* Chun

XU Gang-biao¹, WU Xue-qin¹, JIANG Gui-xiong², HU Shang-li¹,
LIU Xiong-sheng¹, XIAO Yu-fei¹, HAO Bo-bo¹

(¹The Laboratory of Forestry Genetics, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004;

²The Guangxi Zhuang Autonomous Region Forestry Department, Nanning 530028)

Abstract: In this study, 13 *T. odorum* populations was analyzed using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers to investigate the genetic diversity and structure. Eight primers produced discernible markers were applied. The percentage of polymorphic bands at the species and population level were 79.67% and 46.84%, respectively. Shannon's phenotypic diversity index at the species and population level were 0.3880 and 0.2192, respectively. It indicated that *T. odorum* had a slightly higher level of genetic diversity than other related plants of the Magnoliaceae. The coefficient of genetic differentiation (Φ_{ST}) was 0.3752 by molecular variance analysis (AMOVA) indicating the differentiation among populations was significant. Using STRUCTURE program and UPGMA method, the populations were clustered into three groups. The result of correlation analysis showed that genetic distance was significantly positive with geographical distance. The Nankunshan, Bijiasha, and Nongxiangshan populations should be given priority for conservation, because these populations had the highest genetic diversity among all the 13 populations investigated.

Key words: *Tsoongiodendron odorum*; ISSR markers; genetic diversity; population genetic structure

观光木 (*Tsoongiodendron odorum*) 为木兰科高大常绿乔木, 虫媒异花授粉, 结果率低, 种子大^[1], 是中生代白垩纪的孑遗植物^[2], 目前零星分布于我国江西中南部、湖南南部、福建西北部、广东、海南中部、广西东北部、贵州东南部、云南东部以及越南北

部海拔 300 ~ 1100m 的山地常绿阔叶林中及村旁^[3]。尽管观光木分布区广, 但野生种群极小, 多数种群仅有几株甚至 1 株散生木, 属偶见种。目前, 野生种群数量及种群大小仍在减少^[4-7], 已被世界自然保护联盟 (IUCN, international union for conser-

vation of nature) 列为近危物种 ([http://www. iucnredlist. org](http://www.iucnredlist.org)), 被我国先后列为国家Ⅱ级重点保护植物^[8] 和全国极小种群野生植物^[9]。

观光木的研究目前主要集中在生物量及养分循环、群落与种群生态、生理生态与系统发育等基础生物学方面^[7]。为了探讨观光木的濒危机制, 近年来先后开展了大孢子发生、雌配子体形成, 传粉生物学特性、花器官的发生发育等生殖生物学^[1,10-11] 以及种群遗传多样性的研究^[4-7,12]。由于观光木野生种群数量少、个体分散, 野外采样困难, 有关观光木遗传多样性研究的野生种群数量都不超过 4 个。观光木分布片段化、单株零星分布特点使其个体或群体间存在生境条件的差异, 极有可能影响观光木遗传多样性。

ISSR (inter-simple sequence repeat) 分子标记的多态性高、费用低、重复性较好, 已成为当前植物遗传多样性研究的首选标记之一^[13-17]。本研究选取观光木资源分布相对集中的江西、湖南、广东、广西、

贵州 5 省 13 个野生种群为研究对象, 采用 ISSR 分子标记分析其遗传多样性水平和遗传结构, 以期阐明观光木作为一种古老残遗物种对南亚热带环境的适应机制及其进化潜力, 为有效保护观光木遗传资源提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

根据湖南、江西、广东、贵州、广西、云南 6 省 (区) 第 3 次森林资源 2 类调查资料, 于 2011 年 4 月至 2012 年 9 月, 调查了 32 个县 (或自然保护区) 观光木野生资源, 从中选取野生观光木成年个体 4 株以上的县 (或自然保护区) 采样, 共采集 13 个种群 253 株个体 (样株间距离 100 m 以上)。野外采集的新鲜叶片立即放入装有硅胶的密封袋中, 并记录各种群的地理位置及个体数 (表 1、图 1)。样品带回实验室后, 取出叶片放入 -70℃ 冰箱中保存。

表 1 观光木种群采集信息及样本大小

Table 1 Collecting data and samples sizes of *T. odorum*

种群	位置	经度 (E)	纬度 (N)	海拔 (m)	株数
Population	Location	Longitude	Latitude	Altitude	Sample size
NXS	贵州弄相山自然保护区 Nongxiangshan Natural Reserve, Guizhou	109°12′	25°46′	230	21
YK	湖南源口自然保护区 Yuankou Natural Reserve, Hunan	110°59′	24°58′	610	26
BJS	广东笔架山自然保护区 Bijiaasha Natural Reserve, Guangdong	112°01′	24°25′	580	28
NKS	广东南昆山自然保护区 Nankunshan Natural Reserve, Guangdong	113°52′	23°38′	457	32
CBL	广东车八岭自然保护区 Chebaling Natural Reserve, Guangdong	114°10′	24°41′	310	18
FX	广东丰溪自然保护区 Fengxi Natural Reserve, Guangdong	116°46′	24°36′	407	4
JGS	江西井冈山自然保护区 Jinggangshan Natural Reserve, Jiangxi	114°15′	26°36′	354	17
MX	江西崇义县秘溪林场 Mixi Forest Farm, Chongyi County, Jiangxi	114°10′	25°39′	413	25
MZF	江西大余县帽子峰林场 Maozifeng Forest Farm, Dayu County, Jiangxi	114°06′	25°19′	401	22
JPS	江西金盘山自然保护区 Jinpanshan Natural Reserve, Jiangxi	115°13′	25°14′	338	20
JLS	江西九连山自然保护区 Jiulianshan Natural Reserve, Jiangxi	114°28′	24°39′	590	24
CY	江西定南县蔡阳林场 Caiyang Forest Farm, Dingnan County, Jiangxi	115°07′	25°01′	570	11
MRS	广西兴安猫儿山自然保护区 Maershan Natural Reserve, Guangxi	110°26′	25°42′	380	5

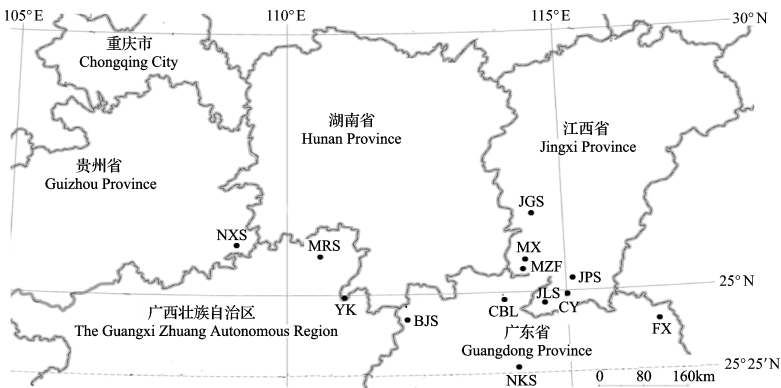


图 1 观光木种群采样点的地理位置

Fig. 1 Geographic locations of *T. odorum* populations sampled

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取、ISSR-PCR 扩增 参考吴雪琴等^[7]的方法,运用 Biophotometer 核酸蛋白分析仪检测 DNA 含量和纯度,Veriti 96 well Thermal Cycler PCR 扩增仪对所有参试样本进行 PCR 扩增,电泳产物用 G-BOX 紫外凝胶成像系统观察。

1.2.2 数据分析 人工判读 PCR 扩增产物的电泳谱带。由于 ISSR 标记为显性标记,每个条带被视为 1 对等位基因的基因型。相同迁移位置上条带有无分别计为 1 和 0,构成二元 ISSR 分子标记数据矩阵。采用 POPGENE 1.31 软件^[18],估算物种与种群多态性条带百分率($P = \text{多态性条带数} / \text{总条带数} \times 100\%$)、种群内和种群间 Shannon 表型多样性指数($H = - \sum p_i \log_2 p_i$, p_i 为第 i 条 ISSR 扩增条带的频率)。种群间多样性组分为 $(H_{SP} - H_{PP}) / H_{SP}$,种群内多样性组分为 H_{PP} / H_{SP} ,式中 H_{SP} 、 H_{PP} 分别表示所有种群表型多样性指数平均值和总体值^[19-20]。

采用 ARLEQUIN 3.1^[21] 中的分子方差分析 (AMOVA, analysis of molecular variance) 软件计算种群内、种群间遗传方差分量 σ_a^2 、 σ_b^2 ,种群遗传分化系数 Φ_{ST} ,以及所有成对种群遗传分化系数 Φ_{ST} 。遗传方差分量和成对种群遗传分化系数的统计显著性均采用 1000 次置换评价。

为了检测参试的观光木种群遗传结构,采用 STRUCTURE 2.3.1^[22] 对所有 ISSR 标记数据进行 Bayesian 分析,推测合理组群数目及个体所在的组

群。组群数目 (K) 设定为 2 ~ 13 (参试种群的数目),假定位点都是独立的,按照程序中显性标记类型,采用非混合 (no admixture) 模型,将 Length of Burn Period 设为 10000, MCMC (markov chain monte carlo) 设为 10000;评价 K 值运行 20 次。依据每次测试过程软件计算的后验概率 $LnP(D)$ 值计算 ΔK 值,绘制 ΔK 曲线图。按照 G. Evanno 等^[23] 提出的依据 $\Delta LnP(D)$ 最大原则,推断最合理的组群数目 K 。

采用 NTSYS-pc 2.1 软件对种群间 Φ_{ST} 统计量距离进行非加权平均配组 (UPGMA, unweighted pair-group method with arithmetic-means) 聚类分析,绘制树状聚类图。利用电子地图 (<http://map.sogou.com>) 计算 13 个观光木野生种群间地理距离, Mantel 统计学检验分析种群间的地理距离和遗传距离相关性,并进行显著性检测 (1000 次置换)。

2 结果与分析

2.1 ISSR 标记扩增的结果

从 100 条 UBC ISSR 引物中筛选出 8 条能够扩增出稳定、清晰条带的 ISSR 引物。参试的 13 个观光木种群 253 株个体共扩增出 182 条带,多态性条带数 145。单条引物扩增的多态性条带数在 14 ~ 20 之间,平均每条引物多态性条带百分比为 79.67% (表 2)。ISSR 扩增产物的分子量大多在 150 ~ 2000 bp 之间,部分 ISSR 扩增的结果见图 2。

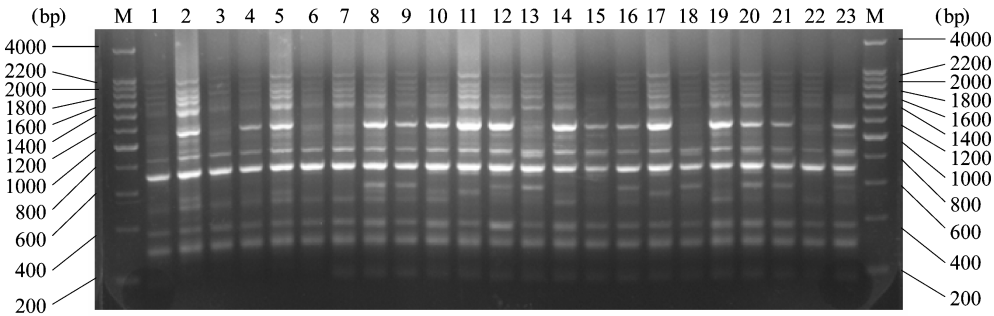


图 2 引物 UBC840 对部分样本的 ISSR 扩增结果

Fig. 2 The ISSR-PCR result of parts of samples using primer UBC840

2.2 种群遗传多样性

根据 ISSR 扩增的分子数据,利用 POPGENE 1.31 软件估算出的观光木各种群的遗传多样性参数见表 3。由表 3 可知,物种水平上,观光木多态性条带百分率 (PPB) 和 Shannon 表型多样性指数 (H_{SP}) 分别为 79.67% 和 0.3880;各种群多态性条带百分率 (PPB) 和 Shannon 表型多样性指数 (H_{POP}) 分

别为 15.38% ~ 62.64%、0.0824 ~ 0.2873。其中,南昆山种群 (NKS) 遗传多样性最高 ($PPB = 62.64\%$, $H_{POP} = 0.2873$), 丰溪种群 (FX) 遗传多样性最低 ($PPB = 15.38\%$, $H_{POP} = 0.0824$)。种群多态性条带百分率 (PPB) 和 Shannon 表型多样性指数 (H_{POP}) 的平均值分别为 46.84% 和 0.2192。由 Shannon 表型多样性指数计算的种群间多样性组分为 0.3923,种

群内多样性组分为 0.6077。

表 2 ISSR 引物序列及扩增结果

Table 2 ISSR primers and their amplification results

引物 Primer	序列(5′-3′) Sequence (5′-3′)	总条带数 Total bands	多态性条带数 Polymorphic bands	多态性条带 百分率(%) Percentage of polymorphic bands
UBC824	(TC) ₈ G	25	20	80.00
UBC835	(AG) ₈ YC	23	17	73.91
UBC840	(GA) ₈ YT	25	20	80.00
UBC841	(GA) ₈ YC	26	19	73.08
UBC853	(TC) ₈ RT	18	16	88.89
UBC854	(TC) ₈ RG	23	19	82.61
UBC874	(CCCT) ₄	23	20	86.96
UBC881	(GGGTG) ₃	19	14	73.68
平均 Mean		22.75	18.75	79.67

表 3 13 个观光木种群遗传多样性分析

Table 3 Genetic diversity among the thirteen populations of *T. odorum* based on ISSR markers

种群 Population	PPB(%)	H_{POP}
NXS	57.14	0.2778
YK	52.20	0.2216
BJS	59.34	0.2854
NKS	62.64	0.2873
CBL	53.85	0.2460
FX	15.38	0.0824
JGS	51.65	0.2295
MX	50.55	0.2541
MZF	44.51	0.2056
JPS	46.70	0.2165
JLS	48.35	0.2231
CY	49.02	0.2253
MRS	17.58	0.0948
平均 Mean	46.84	0.2192
物种 Species	79.67	0.3880

2.3 种群遗传结构

AMOVA 分析结果表明(表 4), $\Phi_{ST}=0.3751(P<0.001)$ 。这说明,参试的 13 个观光木种群间遗传变异占总变异的 37.51%,种群内遗传变异占总变异的 62.49%。一般认为^[20],种群遗传分化系数小于 0.05,种群间遗传分化很小介于 0.06~0.15 之间,

种群间存在中等程度遗传分化;大于 0.16,种群间遗传分化明显;大于 0.25,遗传分化很大。由此可见,观光木野生种群间存在显著的遗传分化。种群间遗传分化显著,可能是种群长期适应当地生态条件及种群隔离的结果。

表 4 观光木种群分子方差分析

Table 4 Molecular variance analysis (AMOVA) of *T. odorum* populations

变异来源 Source of variation	自由度 df	均方和 Sum of squares	方差组分 Variance components	变异百 分比(%) Percentage of variation	P 值 P-value
种群间 Among populations	12	2414.719	9.6541	37.51	<0.001
种群内 Within populations	240	3859.597	16.0817	62.49	<0.001
总和 Total	252	6274.316	25.7358		
$\Phi_{ST}(\%)$	0.3751				

Bayesian 分析结果表明,所有参试的 253 株观光木个体最合理的组群数为 3,遗传结构见图 3。图 3 中,纵坐标 Q 值表示不同植株归属不同组群的比例,红色(组群 I)、绿色(组群 II)、蓝色(组群 III)分别代表组群的趋向,每株个体在 3 种色条中最长色条的颜色决定了该株个体所属的组群。图 3 显示,组群 I(红色)由笔架山(BJS)和南昆山(NKS)种群的全部个体组成;组群 II(绿色)由弄相山(NXS)、源口(YK)、猫儿山(MRS)种群的全部个体组成;组群 III(蓝色)由井冈山(JGS)、帽子峰(MZF)、金盘山(JPS)、九连山(JLS)、蔡阳(CY)、车八岭(CBL)、秘溪(MX)、丰溪(FX)种群组成。参照“ Q 值 >0.6 视为谱系相对单一”的标准^[24],发现 247 株(98.42%) 在某一组群中的 Q 值 >0.6 ,推测其谱系相对单一,可划分到相应的组群中;剩下的 6 株(车八岭种群 1 株,丰溪种群 4 株,秘溪种群 1 株)在任何组群中 Q 值都 ≤ 0.6 ,说明其谱系比较复杂。

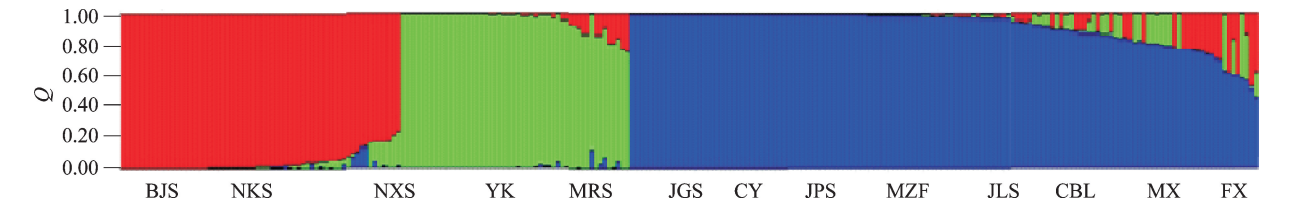


图 3 观光木 253 株个体的遗传结构

Fig. 3 The genetic structure of 253 *T. odorum* individuals

AMOVA 计算的成对种群间遗传分化系数 (Φ_{ST}) 在 0.0066 ~ 0.6580 之间,各种群间遗传分化达到显著水平 ($P < 0.05$) (表 5)。其中,广西猫儿山 (MRS) 与广东丰溪 (FX) 种群遗传分化系数 ($\Phi_{ST} = 0.6580$) 最大,广西猫儿山 (MRS) 与湖南源口 (YK) 种群之间遗传分化系数最小 ($\Phi_{ST} =$

0.0066)。地理距离水平上,贵州弄相山 (NXS) 与广东丰溪 (FX) 种群最远 (787 km),江西秘溪 (MX) 与帽子峰 (MZF) 种群最近 (33 km)。Mantel 相关性矩阵检验表明,种群间遗传距离 Φ_{ST} 与地理距离之间的正相关有统计学意义 ($r = 0.6635, P = 0.002$) (图 4)。

表 5 观光木野生种群间 Φ_{ST} 估算值 (对角线下方) 与地理距离 (km, 对角线上方)

Table 5 Pairwise estimated Φ_{ST} values (below diagonal) and geographic distances (km, above diagonal) among natural populations of *T. odorum*

种群 Population	NXS	YK	BJS	NKS	CBL	FX	JGS	MX	MZF	JPS	JLS	CY	MRS
NXS		247	370	557	532	787	517	547	546	585	571	611	136
YK	0.1468 *		134	322	312	573	369	326	351	418	356	403	117
BJS	0.2850 *	0.3091 *		188	208	472	340	269	275	307	249	299	249
NKS	0.3184 *	0.3346 *	0.1440 *		123	315	333	252	205	220	130	174	429
CBL	0.4307 *	0.4774 *	0.3322 *	0.2985 *		266	221	105	93	123	43	90	401
FX	0.4722 *	0.5275 *	0.3103 *	0.2708 *	0.2319 *		340	275	246	205	226	179	655
JGS	0.5107 *	0.5496 *	0.3882 *	0.3719 *	0.3116 *	0.4493 *		108	133	179	234	228	393
MX	0.4647 *	0.4968 *	0.3543 *	0.3172 *	0.3095 *	0.3914 *	0.0954 *		33	99	125	120	400
MZF	0.5160 *	0.5423 *	0.4071 *	0.3746 *	0.3412 *	0.4482 *	0.1978 *	0.2067 *		71	102	93	420
JPS	0.4952 *	0.5339 *	0.3884 *	0.3724 *	0.3510 *	0.4554 *	0.1800 *	0.1701 *	0.1091 *		107	58	491
JLS	0.5082 *	0.5473 *	0.4306 *	0.4259 *	0.4208 *	0.5280 *	0.2367 *	0.2203 *	0.1802 *	0.1426 *		64	439
CY	0.4740 *	0.5147 *	0.3679 *	0.3413 *	0.1886 *	0.3754 *	0.2701 *	0.2873 *	0.3236 *	0.3260 *	0.3843 *		477
MRS	0.1787 *	0.0066 *	0.3097 *	0.3264 *	0.4883 *	0.6580 *	0.5723 *	0.5016 *	0.5504 *	0.5415 *	0.5520 *	0.5519 *	

* 表示 $P < 0.05$ 水平的差异显著性
* represents significant difference at 0.05 level

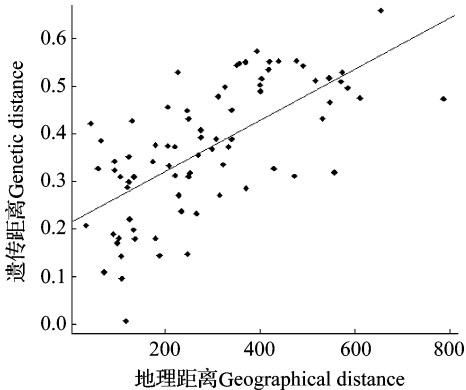


图 4 遗传距离与地理距离相关性

Fig. 4 Correlation between genetic distance and geographical distance of all populations

基于种群间遗传分化系数 Φ_{ST} 的 UPGMA 聚类结果表明,在遗传分化系数 0.36 为阈值的情况下,13 个种群可分为 3 大类,贵州弄相山 (NXS)、湖南源口 (YK)、广西猫儿山种群 (MRS) 聚为第 I 类群;广东南昆山 (NKS)、笔架山 (BJS)、车八岭 (CBL)、丰溪 (FX)、江西蔡阳 (CY) 种群聚为第 II 类群;江西井冈山 (JGS)、秘溪 (MX)、帽子峰 (MZF)、金盘山 (JPS)、九连山 (JLS) 种群聚为第 III 类群 (图 5)。

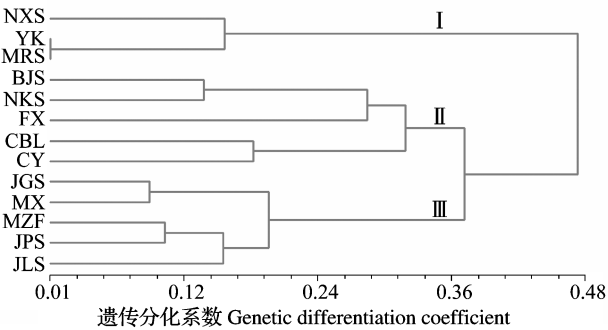


图 5 观光木种群间的 UPGMA 聚类分析图

Fig. 5 Dendrogram of *T. odorum* populations by UPGMA method

3 讨论

3.1 种群遗传多样性

本研究采用 ISSR 标记揭示出观光木物种多态性条带百分率和 Shannon 多样性指数分别为 79.67%、0.3880,与黄久香等^[4-5]采用 RAPD 标记研究的华南地区 3 个野生种群 ($PPB = 78.13\%$, $H_{sp} = 0.3565$)、吴雪琴等^[7]采用 ISSR 标记研究的 4 个野

生种群结果 ($PPB = 80.9\%$, $H_{sp} = 0.3629$) 基本一致。与木兰科其他植物相比,其物种水平遗传多样性高于濒危物种华木莲 *Manglietia deciduas* ($PPB = 17.28\%$, $H_{sp} = 0.0659$)^[25]、天目木兰 *Magnolia amoena* ($PPB = 24.40\%$)^[26]、大果莲 *Manglietia grand* ($PPB = 70.71\%$, $H_{sp} = 0.3651$)^[27]、接近于乐昌含笑 *Michelia chapensis* ($PPB = 81.98\%$, $H_{sp} = 0.4751$)^[28], 略低于鹅掌楸 *Liriodendron chinense* ($H_{sp} = 0.5806$)、北美鹅掌楸 *L. tulipifera* ($H_{sp} = 0.6187$)^[29] 及广布树种乳源木莲 *Manglietia yuyuanensis* ($PPB = 86.11\%$, $H_{sp} = 0.4353$)^[30]。这表明,观光木种内仍存在着丰富的遗传变异,物种进化潜力较大^[31]。

观光木种群多态性条带百分率 ($15.38\% \sim 62.64\%$) 和 Shannon 表型多样性指数 ($0.0824 \sim 0.2873$) 变异较大,其原因可能与其个体数目有关^[32-33],如广东丰溪 (FX) 自然保护区内仅有 4 株野生观光木植株,遗传多样性最低,也可能与种群所处的生境有一定的关联。

3.2 种群遗传结构

种群遗传分化系数是评价种群遗传结构的重要参数。与吴雪琴等^[7]对 4 个野生种群研究结果相比,本研究参试的 13 个野生种群遗传分化系数 ($\Phi_{st} = 0.3751$) 大于其研究结果 ($\Phi_{st} = 0.2495$),也高于黄久香等^[4]采用 RAPD 对 4 个野生种群研究的结果 ($\Phi_{st} = 0.2701$),这可能是由于参试种群数量及种群内个体数目不同造成的^[34]。

植物种群遗传结构一般解释为交配系统、种子传播方式、生活史、分布区大小等因素综合作用的结果^[35-37]。与 H. Nybom^[37]对 116 种植物种群遗传分化系数统计分析的平均值比较,观光木野生种群遗传分化系数 (0.3751) 高于异交 (0.27),低于自交 (0.65),略低于混合交配 (0.40) 系统植物,这与观光木虫媒异花授粉的特征不符,可能是观光木种群之间多为高山阻隔,加剧了种群间的遗传分化。高于动物 (0.27) 或水传播种子 (0.25),低于重力传播种子 (0.45) 植物,可能与鸟类、啮齿目动物喜食其红色种子^[2,38],被食后的种子大部分丧失发芽力^[5,39]有关;高于长寿命林木 (0.25),与广布种 (0.34) 相接近,基本上符合观光木为多年生高大乔木,分布区较广的生物学特征。

比较 STRUCTURE 和 UPGMA 结果,个体谱系相对单一 ($Q \geq 0.6$) 的种群在两种分析方法中类群划分基本一致,而混合来源、遗传组成比较复杂

的种群 ($Q < 0.6$) 的种群,其类群划分有些差异。如个体谱系比较单一的弄相山 (NXS)、源口 (YK)、猫儿山 (MRS) 种群在 STRUCTURE 分析中被划分为组群 I,在 UPGMA 聚类分析中也聚为一类。包含有遗传组成比较复杂个体的种群,如车八岭 (CBL)、丰溪 (FX)、秘溪 (MX) 种群,在 STRUCTURE 分析中被划分为一类,但在 UPGMA 聚类分析中,车八岭 (CBL)、丰溪 (FX) 种群与南昆山 (NKS)、笔架山 (BJS)、蔡阳 (CY) 种群聚为一类群,而秘溪 (MX) 种群与井冈山 (JGS)、帽子峰 (MZF)、金盘山 (JPS)、九连山 (JLS) 种群聚为另一类群。这种现象在其他一些植物种群遗传结构分析中也存在类似情况^[20,40]。Mantel 相关性矩阵检验认为,观光木种群遗传距离与地理距离相关性有统计学意义,这表明地理距离隔离在观光木种群遗传分化作用比较明显,这与前人研究结果相一致^[4-5,7]。

3.3 遗传资源保护

探讨物种濒危机制是当前生物多样性研究的热点之一,也是保护生物学的核心工作。研究表明,尽管残存的观光木野生种群很小,但其物种和种群都维持较高水平的遗传变异,这说明观光木的种群遗传进化潜力较大,并不是其濒危的主要原因。观光木濒危原因可能与其大孢子发生、发育异常、大量花粉败育等不利生殖发育因子^[11],导致其自然授粉、结实率低、天然更新不良等因素有关^[9]。虽然观光木分布区较广,但主要分布在人类居住处周围,人类活动对其资源及其生存环境严重破坏,这也可能是其濒危的重要因素之一^[2]。

目前,残存的观光木野生种群很小、片断化分布、种群内个体散生等种群特征,会产生遗传漂变和近交衰退的遗传后果,将可能导致遗传多样性降低、有害等位基因积累和适合度降低,最终使物种面临更高的灭绝风险^[41-42],因此,开展观光木遗传资源保护工作迫在眉睫。基于本研究结果,遗传多样性最高的广东南昆山 (NKS)、广东笔架山 (BJS) 及贵州弄相山 (NXS) 3 个野生种群,个体数量较多且个体分布相对集中,应优先加以保护。同时,要特别重视生长在自然村落旁及易场方沟边的观光木保护工作,以免因人为破坏或自然灾害而造成遗传多样性丢失。对于株间距 1000 m 以上的野生幼小植株,建议进行互相移植,以增加种群密度,并加强林分抚育管理,促进其健康生长。

本研究是基于 ISSR 标记研究观光木种群遗传多样性与遗传结构,以期探讨其濒危机制。尽管 ISSR 标记具有多态性高、费用低、重复性较好等优点,但也是显性标记,获得的分子数据是基因型数据,其

结果仅揭示了观光木种群的核基因组遗传变异模式及变异水平,而不能估算基因多态性及基因流动大小等种群遗传学参数^[43],更不能反映观光木种群整个基因组(核、叶绿体和线粒体)的变异模式。另外,ISSR 标记与 SSR(simple sequence repeat)、AFLP(amplification fragment length polymorphism)等标记一样,虽然比 RAPD 标记重复性好,但仍存在一定的局限性,加之本研究筛选出适合于所有参试个体都能扩增出重复性高、条带清晰的 ISSR 引物相对较少,这可能会给研究结果带来一些偏差。因此,建议进一步开展重复性更高的核基因组、叶绿体基因组和线粒体基因组的 DNA 测序分析,并结合生殖生态学、生殖解剖学研究,以期获得更多、更可靠的观光木种群遗传多样性及其濒危信息,为科学制定观光木遗传资源保护策略提供更全面的理论依据。

参考文献

[1] 曾庆文,高泽正,邢福武,等. 濒危植物观光木传粉生物学的初步研究[C]//第五届生物多样性保护和持续利用研讨会论文集. 北京:气象出版社,2004:199-204

[2] 邓贤兰,吴杨,赖弥源,等. 江西中南部观光木种群及所在群落特征研究[J]. 广西植物,2012,32(2):179-184

[3] Xia N H, Liu Y H, Nooteboom H P. Flora of China [M]. Beijing: Science Press, 2009:80

[4] 黄久香,庄雪影. 观光木种群遗传多样性研究[J]. 植物生态学报,2002,26(4):413-419

[5] 黄久香,庄雪影. 华南三地观光木遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 华南农业大学学报:自然科学版,2002,23(2):54-57

[6] 王霞,王静,蒋敬虎,等. 观光木片段化居群的遗传多样性和交配系统[J]. 生物多样性,2012,20(6):676-684

[7] 吴雪琴,徐刚标,梁艳,等. 南岭地区观光木自然和人工迁地保护种群的遗传多样性[J]. 生物多样性,2013,21(1):71-79

[8] 傅立国,金鉴明. 中国植物红皮书——稀有濒危植物:第一册[M]. 北京:科学出版社,1992:454-455

[9] 国家林业局野生动植物保护与自然保护区管理司,中国科学院植物研究所. 中国珍稀濒危植物图鉴[M]. 北京:中国林业出版社,2013:224

[10] 唐源江,叶秀麟,曾庆文,等. 观光木的大孢子发生与雌配子体形成[J]. 热带亚热带植物学报,2007,15(1):20-22

[11] 付琳,曾庆文,徐凤霞,等. 观光木的花器官发生[J]. 热带亚热带植物学报,2007,15(1):30-34

[12] Jiang J H, Wang J, Kang M, et al. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Tsoongiodendron odorum* (Magnoliaceae) [J]. Am J Bot, 2011, 98(10):284-286

[13] 孙群,佟汉文,吴波,等. 不同种源乌拉尔甘草形态和 ISSR 遗传多样性研究[J]. 植物遗传资源学报,2007,8(1):56-63

[14] 孙芳,杨敏生,张军,等. 刺槐不同居群遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 植物遗传资源学报,2009,10(1):91-96

[15] 黄文霞,何仪,何觉民,等. 高效能源植物绿玉树种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 植物遗传资源学报,2010,11(4):487-490

[16] 李国田,艾呈祥,张力思,等. 核桃实生居群遗传多样性 ISSR 分析[J]. 植物遗传资源学报,2011,12(4):640-645

[17] 龚榜初,刘国彬. 锥栗自然居群遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 植物遗传资源学报,2013,14(4):581-587

[18] Yeh F C, Yang R C, Boyle T. POPGENE version 1.31, Microsoft window-based freeware for population genetic analysis [M]. Edmonton: University of Alberta and Centre for International Forestry Research, 1999

[19] Gillies A C, Navarro M C, Lowe A J, et al. Genetic diversity in Mesoamerican populations of mahogany (*Swietenia macrophylla*),

assessed using RAPD[J]. Heredity, 1999, 83:722-732

[20] Souza J G, Souza V A, Lima P S. Molecular characterization of *Platonia insignis* Mart. ("bacurizeiro") using inter simple sequence repeat (ISSR) markers[J]. Mol Biol Rep, 2012, 40(5):3835-3845

[21] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.1): an integrated software package for population genetics data analysis [J]. Evol Bioinform Online, 2006, 1:47-50

[22] Pritchard J K, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data [J]. Genetics, 2000, 155:945-959

[23] Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study [J]. Mol Ecol, 2005, 14(8):2611-2620

[24] 刘丽华,王丽新,赵昌平,等. 光温敏二系杂交小麦恢复系遗传多样性和群体结构分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2009, 25(9):867-875

[25] 林新春,俞志雄,袁利洪,等. 濒危植物华木莲的遗传多样性研究[J]. 江西农业大学学报, 2003, 25(6):805-810

[26] 刘登义,储玲,杨月红. 珍稀濒危植物天目木兰遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 应用生态学报, 2004, 15(7):1139-1142

[27] 陈少瑜,韩燕,吴涛,等. 木兰科濒危植物大果木莲遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 福建林学院学报, 2010, 30(1):56-60

[28] 姜景民,滕花景,袁金玲,等. 乐昌含笑种群遗传多样性的研究[J]. 林业科学研究, 2005, 18(2):109-113

[29] 罗光佐,施季森,尹佟明,等. 利用 RAPD 标记分析北美鹅掌楸种类遗传多样性[J]. 植物资源与环境学报, 2000, 9(2):9-13

[30] 李因刚,周志春,范辉华,等. 乳源木莲种源遗传多样性和遗传分化[J]. 林业科学研究, 2008, 21(4):582-586

[31] Frankham R, Ballou J D, Briscoe D A. Introduction to conservation genetics [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2002:2-9, 96-112

[32] 陈娇,王小蓉,汤浩茹,等. 基于 SSR 标记的四川野生中国樱桃遗传多样性和居群遗传结构分析[J]. 园艺学报, 2013, 40(2):333-340

[33] Rusterholz H P, Aydin D, Baur B. Population structure and genetic diversity of relict populations of *Alyssum montanum* on limestone cliffs in the Northern Swiss Jura mountains[J]. Alpine Bot, 2012, 122(2):109-117

[34] Estoup A, Angès B. Microsatellites and mini-satellites for molecular ecology: Theoretical and empirical considerations [C]// Advances in molecular ecology. Amsterdam: IOS Press, 1998:55-86

[35] Glémin S, Bazin E, Claretworth D. Impact of mating systems on patterns of sequence polymorphism in flowering plants [J]. P Roy Soc B-Biol Sci, 2006, 1604(273):3011-3019

[36] Nybom H, Bartish I V. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants [J]. Perspect Plant Ecol, 2000, 3(2):93-114

[37] Nybom H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants [J]. Mol Ecol, 2004, 13(5):1143-1156

[38] 许涵,庄雪影,黄久香,等. 广东省南昆山观光木种群结构及分布格局[J]. 华南农业大学学报, 2007, 28(2):73-77

[39] 黄忠良,王俊浩. 自然保护区-就地保护与植物园-迁地保护 [C]//面向 21 世纪的中国生物多样性保护——第三届全国生物多样性保护与持续利用研讨会论文集. 北京:中国林业出版社, 1998:30-37

[40] Lu J J, Hu X, Liu J J, et al. Genetic diversity and population structure of 151 *Cymbidium sinense* cultivars [J]. J Horticult Forest, 2012, 3(4):104-114

[41] Ellstrand N C, Elam D R. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation [J]. Annu Rev Ecol Syst, 1993, 24:217-242

[42] 阮咏梅,张金菊,姚小洪,等. 黄桷树孤立居群的遗传多样性及其小尺度空间遗传结构 [J]. 生物多样性, 2012, 20(4):460-469

[43] Anne C. Choosing the right molecular genetic markers for studying biodiversity: from molecular evolution to practical aspects [J]. Genetic, 2006, 127:101-120